

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Angiogénese no Mieloma Múltiplo

Filipa Alexandra Mourinha Pateiro

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Lisboa, 2019

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Angiogénese no Mieloma Múltiplo

Filipa Alexandra Mourinha Pateiro

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientador: Dra. Maria Leonor Ferreira Estevão Correia, Professora Auxiliar

Lisboa, 2019

ÍNDICE

I - Agradecimentos	4
II - Resumo	5
III - Abstract	7
IV - Índice de Figuras.....	9
V - Lista de Abreviaturas	10
VI – Objetivo	12
VII – Introdução.....	13
VII. 1 - Vasculogénese	13
VII. 2 – Angiogénese	13
2.1 – Fatores angiogénicos	16
2.2 - Células envolvidas na interação com os plasmócitos	19
2.2.1. Células endoteliais	19
2.2.2. Células endoteliais progenitoras	22
2.2.3. Monócitos/macrófagos.....	23
2.2.4. Mastócitos	25
VII. 3 - Gamopatias monoclonais	26
3.1 Gamapatia monoclonal de significado indeterminado	28
3.2 Mieloma múltiplo	30
3.2.1 Microambiente medular no mieloma múltiplo	32
3.2.2 Biomarcadores no mieloma múltiplo.....	35
3.2.3 Diagnóstico	37
3.2.3.1. Clínico	38
3.2.3.2. Hematológico.....	39
3.2.3.3. Bioquímico	40
3.2.3.4. Imunológico	41
3.2.3.5. Citogenético.....	41
3.2.3.6. Imagiológico.....	42
3.2.4 Terapêutica do mieloma múltiplo baseada na angiogénese	42
3.2.4.1 Terapêutica utilizada atualmente.....	42
3.2.4.2. Fármacos em desenvolvimento	47
VIII – Materiais e Métodos	49
IX – Resultados e Discussão.....	50
X – Conclusões e Perspetivas Futuras	51
XI - Bibliografia	54

I - AGRADECIMENTOS

À professora Doutora Leonor Correia, pela orientação, incentivo e disponibilidade que sempre demonstrou desde o início, pela partilha do seu conhecimento, compreensão e simpatia ao longo de todo este tempo.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa e ao Núcleo de Estágios.

À minha filha, Constança, por me mostrar que o amor é sempre a resposta. É nos teus abraços, nos teus beijinhos, nos teus “adoro ti” que eu recarrego forças. Obrigada por me escolheres como tua mãe!

À minha família, pais, irmão e avós, por todos os valores transmitidos, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pela ajuda em todos os momentos e por acreditarem sempre em mim. Sem vocês e sem o vosso carinho seria impossível terminar esta etapa.

À Farmácia Ouressa e à Farmácia Primavera, em especial à Ritinha, à Lucie, à Sophie, à Sara e à Dra. Inês. Deram-me os melhores ensinamentos, não só para a vida profissional, mas também para a minha vida pessoal. Graças a vocês, percebi que nas fases mais difíceis, é também a altura em que surgem as melhores pessoas na nossa vida. Um obrigado nunca vai ser suficiente para agradecer o que fizeram por mim!

À D.Ana, à Bia, à Maria e à Cláudia, a “minha família” quando a de sangue estava a alguns quilómetros de distância.

A todos os meus amigos, por todo o carinho, pelo apoio, por me inspirarem todos os dias e por me motivarem, sempre, a procurar novos desafios.

À Farmácia Holon Redondo, por me terem recebido tão bem e por toda a vossa compreensão nesta etapa final.

Ao Dr. Manuel, por todo o seu apoio no meu processo de autoconhecimento e fortalecimento.

A TODOS, UM MUITO OBRIGADA!

II - RESUMO

O mieloma múltiplo é uma neoplasia maligna, caracterizada pela proliferação descontrolada dos plasmócitos. Estas células alojam-se e expandem-se na medula óssea onde causam um desequilíbrio na remodelação do osso com o aumento da reabsorção e a diminuição da sua formação, principais características clínicas encontradas na maioria dos doentes com mieloma múltiplo.

O diagnóstico do mieloma múltiplo é efetuado a partir de diferentes testes de diversas áreas. O diagnóstico clínico é dificultado pelo facto de os sintomas variarem de doente para doente, por não serem específicos desta patologia e, ainda, pelo facto de não estarem, por vezes, presentes nos estadios iniciais da doença. Os sintomas mais comuns são as fraturas ósseas, a hipercalcémia, a diminuição da função renal e a anemia. No diagnóstico laboratorial recorre-se ao hemograma, onde se avalia o número e a morfologia das células sanguíneas, à determinação da velocidade de sedimentação, ao mielograma e/ou à biópsia da medula óssea, onde se encontra um número anormal de plasmócitos, como característica típica desta doença. O diagnóstico bioquímico, nomeadamente a eletroforese das proteínas, permite detetar a presença da proteína monoclonal (M), característica desta doença. A imunologia permite quantificar e identificar as imunoglobulinas que estão aumentadas no doente e os estudos citogenéticos avaliam a presença de alterações no DNA. Para visualizar a existência de lesões ósseas e qual a sua extensão, recorre-se à radiologia convencional, à tomografia computadorizada e, ainda, à ressonância magnética.

Durante a progressão da doença, ocorrem diversas interações entre as células plasmáticas do mieloma múltiplo e o microambiente medular, que permitem que ocorra a angiogénese. Este processo deve-se à produção de diversos fatores promotores, tais

como o fator de crescimento endotelial vascular e o fator de crescimento de fibroblastos 2, que são secretados diretamente pelas células tumorais e que atraem as células endoteliais progenitoras iniciando, assim, o processo da angiogénese.

A interação entre os plasmócitos e as células do estroma medular permite a secreção de citocinas, como a interleucina-6, responsáveis pela produção de fatores promotores da angiogénese por outras células presentes no microambiente medular. Os macrófagos, os mastócitos e as células endoteliais progenitoras são importantes no mieloma múltiplo, uma vez que a interação entre todas estas células, mediada por diversas citocinas, recetores e moléculas de adesão é responsável por estimular e modular a angiogénese, nesta patologia.

Atualmente, a terapêutica é instituída apenas aos doentes com mieloma múltiplo sintomático e é baseada no uso de três fármacos principais: a talidomida, a lenalidomida e o bortezomib. Contudo, o mieloma múltiplo continua incurável, daí a necessidade de se perceber qual o papel da angiogénese nesta doença. A terapêutica do mieloma múltiplo deve ser direcionada não só para as células plasmáticas, mas também para a angiogénese, uma vez que se pode considerar que este fenómeno é fundamental para a progressão da doença. Os fármacos atualmente em estudo e promissores que se baseiam no bloqueio da angiogénese são o aflibercept, o RLYE, o pazopanib e o AMD3100.

Palavras-chave: mieloma múltiplo; angiogénese; microambiente medular; célula endotelial progenitora; alvo terapêutico.

III - ABSTRACT

Multiple myeloma is a malignant neoplasm characterized by uncontrolled proliferation of plasma cells. These cells home and expand in the bone marrow. In this place, they cause an unbalanced bone remodeling with increased resorption and decreased bone formation, which is the main clinical feature in most patients with multiple myeloma.

The diagnosis of this disease is made from different tests. The clinical diagnosis can be difficult because symptoms of multiple myeloma are different from patient to patient. The symptoms are not specific to this condition and, sometimes, they are not present in the early stages of the disease. However, the most common symptoms are bone fractures, hypercalcemia, decreased renal function and anemia. In the laboratory diagnosis the blood count is used, which evaluates the number of blood cells. The erythrocyte sedimentation rate is also done. In the bone marrow biopsy we can see a high number of plasma cells with typical characteristics. The protein electrophoresis evaluates the presence of monoclonal protein, characteristic of this disease. Immunology allow us to know which immunoglobulins are increased in the patient and the presence of DNA changes are evaluated by cytogenetic studies. Conventional radiology, computed tomography and magnetic resonance imaging are used to assess the existence of bone lesions and their extent.

During disease progression, several interactions occur between multiple myeloma plasma cells and the bone marrow microenvironment, which contribute to the angiogenesis. This process is due to the production of several promoter factors, such as vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2, which are secreted directly by tumor cells and attract progenitor endothelial cells to bone marrow.

The interaction between plasma cells and stromal cells allows the secretion of cytokines, such as interleukin 6, which induces the production and secretion of angiogenic factors and, consequently, they promote angiogenesis. Macrophages, mast cells, and progenitor endothelial cells are important in multiple myeloma since the interaction between all these cells, mediated by various cytokines, receptors and adhesion molecules is responsible for stimulating and modulating angiogenesis in this pathology.

Currently, therapy is applied only for patients with symptomatic multiple myeloma and is based on the use of three main drugs: thalidomide, lenalidomide and bortezomib. However, multiple myeloma remains incurable, so we need to understand the role of angiogenesis in this disease. The therapy of multiple myeloma should target not only multiple myeloma cells, but also the angiogenesis, because this phenomenon is fundamental for disease progression. For angiogenesis blocking, aflibercept, RLYE, pazopanib and AMD3100 are promising drugs currently under study.

Key words: multiple myeloma; angiogenesis; bone marrow microenvironment; progenitor endothelial cell; therapeutic target.

IV - ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - “Switch” angiogénico no mieloma múltiplo. Fator de crescimento endotelial vascular (FCEV); fator de crescimento fibroblástico 2 (FCF-2); Angiopoietina -1 (Ang-1); células do estroma da medula óssea (CEMO); fator de crescimento hepatocitário (FCH).

Figura 2 - Vias autócrinas e parácrinas mediadas pelo fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) no mieloma múltiplo. Recetor do FCEV (RFCEV); interleucina (IL) 6.

Figura 3 - Mecanismos envolvidos na formação dos vasos sanguíneos, no mieloma múltiplo. Fator derivado de células do estroma 1 (FDCE-1); fator de crescimento endotelial vascular (FCEV); fator de crescimento fibroblástico 2 (FCF-2); fator de necrose tumoral α (FNT- α); angiopoietina 1 (Ang-1); metaloproteinases da matriz (MPMs); fator de crescimento hepatocitário (FCH); fator de crescimento semelhante à insulina 1 (FCI-1); fator de transformação do crescimento β (FTC- β); interleucina (IL)-6.

Figura 4 - Perfil electroforético de proteínas totais séricas, evidenciando os picos monoclonal (A) e policlonal (B) nas frações correspondentes às γ -globulinas.

Figura 5 - Distribuição das gamopatias monoclonais diagnosticadas na Clínica Mayo durante 2011. O mieloma múltiplo (MM) representa 20% dos casos diagnosticados naquela clínica, precedido apenas pela gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) com uma percentagem de 51%. A amiloidose primária representa 10% dos casos diagnosticados, seguida das doenças linfoproliferativas, do mieloma múltiplo latente, do plasmocitoma solitário ou extramedular e da macroglobulinemia de Waldenström.

Figura 6 - Plasmócitos presentes na medula óssea de um doente com mieloma múltiplo.

Figura 7 - Representação esquemática do microambiente da medula óssea e respetivos nichos.

Figura 8 - Formação de “rouleaux” de glóbulos vermelhos em sangue periférico de doentes com mieloma múltiplo.

Figura 9 - Mecanismos de ação da lenalidomida. Fator de crescimento endotelial vascular (FCEV); fator de necrose tumoral α (FNT- α); interleucina (IL); “natural killer” (NK); mieloma múltiplo (MM); “vascular cell adhesion molecule 1” (VCAM-1); “intercellular adhesion molecule 1” (ICAM-1); interferão γ (IFN- γ); células do estroma da medula óssea (CEMO).

Figura 10 - Mecanismo de ação do bortezomib.

V - LISTA DE ABREVIATURAS

Ang-1 - Angiopietina-1

β_2 M - β_2 - microglobulina

BCMA - B-cell maturation antigen

CAR - Chimeric antigen receptor

CCR - CC chemokine receptor

CEH - Células estaminais hematopoiéticas

CEMO - Células do estroma da medula óssea

CP - Células plasmáticas

CRAB - Calcium elevation, renal insufficiency, anemia, bone disease

CE - Células endoteliais

CEP - Células endoteliais progenitoras

CLL - Cadeias leves livres

CXCR - C-X-C motif chemokine receptor

ERK-2 - Extracellular signal-regulated kinase 2

FCDP - Fator de crescimento derivado de plaquetas

FCEV - Fator de crescimento endotelial vascular

FCF-2 - Fator de crescimento fibroblástico 2

FCH - Fator de crescimento hepatocitário

FCI-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1

FDCE-1 - Fator derivado de células do estroma 1

FISH - Fluorescence in situ hybridization

FIH- 1α - Fator indutor de hipóxia 1α

FNT- α - Fator de necrose tumoral α

FTC- β - Fator de transformação do crescimento β

GM - Gamapatia monoclonal

GMSI - Gamapatia monoclonal de significado indeterminado

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule 1

Ig(s) - Imunoglobulina(s)

IL(s) - Interleucina(s)

IMWG - International myeloma working group

IFN- γ - Interferão γ

MEC - Matriz extracelular

MM - Mieloma múltiplo

MMI - Mieloma múltiplo indolente

MO - Medula óssea

OC - Osteoclastos

OPG - Osteoprotegerina

PIM 1 α - Proteína inflamatória dos macrófagos 1 alfa

PM - Proteína monoclonal ou paraproteína

RANK - Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RFCEV - Recetor do fator de crescimento endotelial vascular

RM - Ressonância magnética

SEMA3A - Semaforina 3A

SIE - Sistema internacional de estadiamento

SP - Sangue periférico

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule 1

VI – OBJETIVO

O mieloma múltiplo (MM) representa 1% de todas as neoplasias e é considerado o segundo cancro mais comum, dentro das patologias do sangue. O objetivo deste trabalho foi perceber de que forma a angiogénese se processa nesta doença, quais os seus intervenientes e, ainda, compreender de que forma poderá ser um alvo terapêutico desta patologia.

No MM as células plasmáticas (CP) interagem com as células hospedeiras circundantes e com a matriz extracelular (MEC) da medula óssea (MO). O papel destes componentes tem constituído uma intensa área de investigação, de forma a proporcionar informação acerca das modificações fisiopatológicas que ocorrem nesta doença.

A interação entre as CP e o microambiente da MO, é responsável pelo processo de neovascularização, a principal característica da progressão do MM. Neste processo estão envolvidos diversos fatores promotores da angiogénese, tais como o fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV), o fator de crescimento fibroblástico (FCF-2), a interleucina (IL) 6, entre outros.

Apesar de todos os progressos efetuados até aqui, é essencial continuar a investigar quais os intervenientes da angiogénese e de que forma nela participam. Pretende-se a obtenção de fármacos mais direcionados e que apresentem menos efeitos adversos prolongando, assim, a sobrevivência dos doentes e o aumento da sua qualidade de vida.

VII – INTRODUÇÃO

VII. 1 - VASCULOGÉNESE

O desenvolvimento do sistema vascular ocorre a partir de dois processos, a vasculogénese e a angiogénese.

A vasculogénese tem início nos angioblastos que se diferenciam em células endoteliais progenitoras (CEP). Posteriormente, ocorre a proliferação e a diferenciação das CEP em células endoteliais (CE). Para além destas células, há também a evidência de que as células mononucleadas periféricas também contribuem para a vasculogénese. Tanto os monócitos, como os macrófagos, na presença de citocinas pró-angiogénicas, podem dar origem às CE, ao sofrerem transdiferenciação (1).

Embora a vasculogénese seja característica da fase embrionária, foi demonstrado que este processo também ocorre em fase pós-natal, tanto em condições fisiológicas como patológicas (2).

VII. 2 – ANGIOGÉNESE

A angiogénese é um processo fortemente regulado, do qual resulta a formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes (1).

Todas as células do organismo necessitam de nutrientes e oxigénio para manter a sua função fisiológica e, ainda, de meios para excretar os metabolitos desnecessários ou até mesmo tóxicos, resultantes da atividade celular. Estes processos apenas ocorrem devido à existência de uma rede vascular sanguínea e linfática, constituída por CE, que estão organizadas em forma de túbulos de diferentes calibres, de forma a garantir uma cobertura total do corpo humano. Para que possam existir as trocas gasosas e de nutrientes

com os tecidos e, também, o transporte de algumas células do plasma, que são necessárias em locais específicos, é necessário que estes vasos possuam uma determinada permeabilidade (3).

A angiogénese pode ser diferenciada em fisiológica ou patológica. A fisiológica é crucial durante a embriogénese e depois do nascimento, sendo responsável por formar a rede vascular normal nos tecidos adultos. A angiogénese patológica está presente em diversas situações, como a inflamação crónica, a cicatrização de feridas, as doenças cardiovasculares, as isquémias e as neoplasias (3).

Nas neoplasias, a angiogénese é um fator fundamental para o crescimento das células tumorais e, também, para a formação de metástases, pois a entrada de células neoplásicas na circulação e a invasão de outros tecidos é facilitada pela vasculatura neoformada (3).

A angiogénese pode ser diretamente estimulada pelo próprio tumor ou por outras células e pela MEC próxima do tumor. As CE mais próximas são ativadas para formar os novos vasos (1).

A vasculatura formada pelo processo de angiogénese tumoral é muito diferente da vasculatura normal. Em comparação, a disposição das CE que compõem a nova vasculatura é muito mais desorganizada. Para além disso, os novos vasos apresentam uma menor resistência e uma permeabilidade muito aumentada, que pode ser responsável pela migração de células tumorais para outros tecidos corporais, podendo dar origem a novas metástases (1).

A angiogénese, quando patológica, é um fenómeno sem controlo e limite no tempo, tendo um papel bastante importante para o crescimento, invasão e metastização do tumor durante a transição da fase avascular para a fase vascular. O espaço temporal em que ocorre a transição do estado de dormência avascularizado a um estado

hipervascularizado e de possível rápida progressão de um tumor, denomina-se *switch* angiogénico. Este fenómeno, representado na Figura 1, é precedido pela expressão e ativação de oncogenes (*c-myc*, *c-fos*, *c-jun* e *ets-1*) que codificam fatores promotores da angiogénese, como consequência de translocações nas imunoglobulinas (Igs) e da instabilidade genética dos plasmócitos em situações de hipóxia, por exemplo. Desta forma e devido à expansão clonal e a modificações epigenéticas, as células cancerígenas adquirem um fenótipo angiogénico, ocorrendo posteriormente a mudança de CD45+ para CD45-, nas células produtoras de FCEV (4).

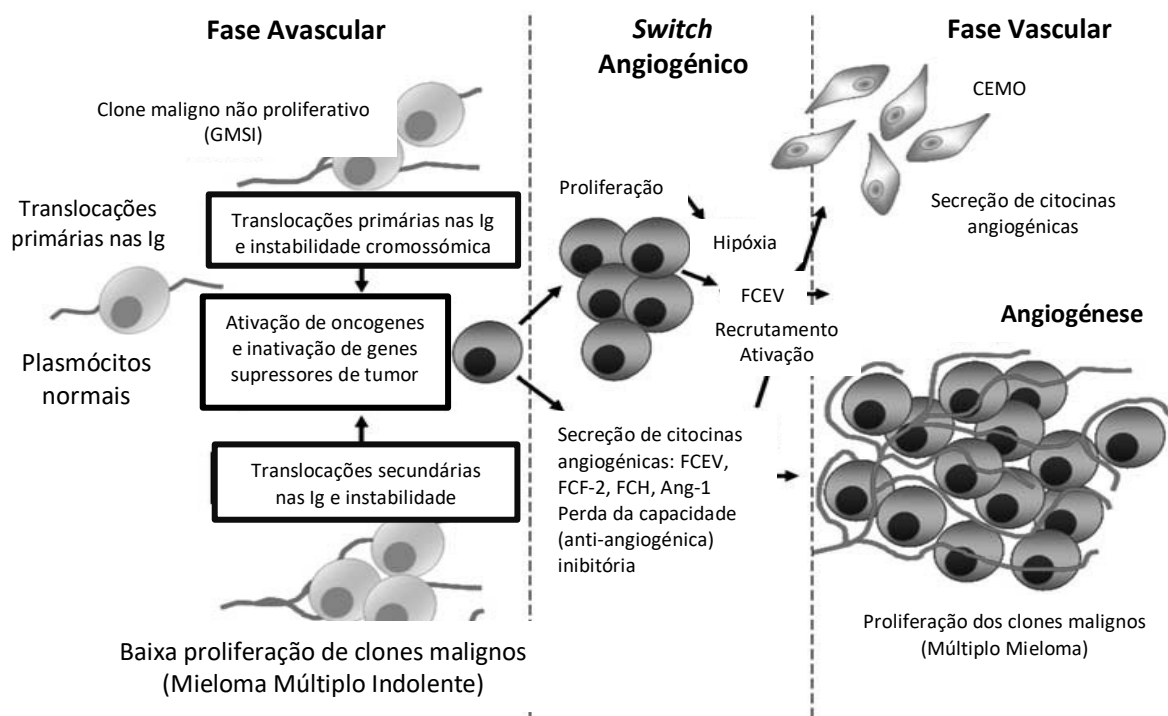


Figura 1 – “Switch” angiogénico no mieloma múltiplo; fator de crescimento endotelial vascular (FCEV); fator de crescimento fibroblástico 2 (FCF-2); Angiopoietina -1 (Ang-1); células do estroma da medula óssea (CEMO); fator de crescimento hepatocitário (FCH). Adaptado de (4).

As translocações, a instabilidade dos cromossomas, a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, com consequente secreção de diversas citocinas, tais como o FCEV, o FCF-2, o fator de crescimento hepatocitário (FCH) e a

Angiopoietina-1 (Ang-1), estão na origem do *switch* angiogénico. Para além destes fenómenos verifica-se, ainda, hipóxia dos tecidos com consequente secreção de FCEV e ativação das células do estroma da medula óssea (CEMO) (4).

Na fase pré-vascular as células tumorais proliferam, por vezes tão rapidamente quanto no tumor vascularizado. No entanto, a taxa de morte das células tumorais equilibra essa proliferação e mantém a massa tumoral em estado estacionário (5).

O nível de indutores e inibidores da angiogénese vai definir os estados de diferenciação celular. Este equilíbrio pode ser alterado pelo aumento da expressão génica do ativador, alteração da biodisponibilidade ou atividade das proteínas indutoras ou redução das concentrações dos inibidores endógenos da angiogénese (5).

2.1 – FATORES ANGIOGÉNICOS

O FCEV participa na proliferação e na quimiotaxia não só das CEs, mas também das CEMO. Através do recetor do fator de crescimento endotelial vascular (RFCEV)-1, o FCEV atua como um indutor autócrino de crescimento e quimiotaxia (Figura 2). Por outro lado, através do recetor 2 do FCEV, o FCEV induz as CEMO a aumentar a produção de IL-6, sendo esta IL um dos fatores mais importantes para a sobrevivência e crescimento dos plasmócitos no MM. Este processo representa o circuito parácrino para o crescimento tumoral (6,7).

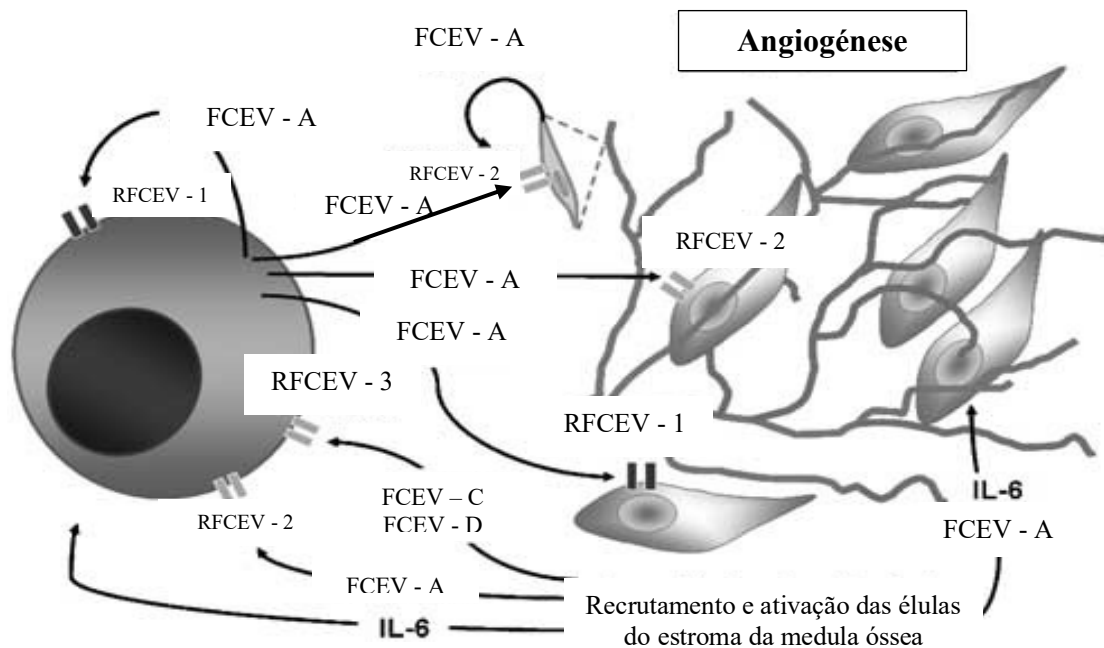


Figura 2 – Vias autócrinas e parácrinas mediadas pelo fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) no mieloma múltiplo. Recetor do FCEV (RFCEV); interleucina (IL) 6. Adaptado de (4).

A adesão dos plasmócitos às CEMO leva a um aumento da produção de FCEV, pelas CE e pelas CEMO, induzindo uma intensificação da angiogénese. Outra molécula que participa na regulação da produção de FCEV pelas CP é o fator de necrose tumoral α (FNT- α), produzido pelas CEMO. Este fator é responsável por mediar a regulação positiva das moléculas de adesão dos plasmócitos e das CEMO levando, desta forma, ao aumento da ligação das CP às CEMO e indução da secreção de IL-6 e do FCEV pelas CEMO, os quais são responsáveis pelo *homing* e pela migração das CP, bem como pela angiogénese. O FCEV é importante na inibição de proteínas, como a semaforina 3A (SEMA 3A), que são ativadas de forma a limitarem o processo de angiogénese da própria célula (2).

Foram encontrados níveis elevados de FCEV no soro de 65% de doentes afetados por diferentes tipos de cancros com metástases, o que sugere que este fator de crescimento tem um papel muito importante na progressão das neoplasias. Para além do anteriormente

referido verificou-se, também, a presença de mRNA de FCEV no plasma de células de doentes com MM, o que leva a concluir que o FCEV é um mediador-chave da angiogénese embrionária e fisiológica pós-natal (1).

A importância do FCF-2 prende-se com o facto de ele ser um forte ativador da proliferação endotelial e, desta forma, estimular a angiogénese. Este fator é ainda responsável por promover a proliferação de fibroblastos do estroma e a formação de MEC, o que leva a uma fibrose excessiva da MO. Também atua diretamente nos plasmócitos, ligando-se aos seus recetores de FCF de maior afinidade. Níveis elevados deste fator estão presentes no soro e na urina de doentes com diferentes tipos de cancro e, ainda, em extratos de CP. Este nível de concentração foi, então, correlacionado com a atividade da doença. Para além deste facto, foi ainda demonstrado que os anticorpos anti-FCF-2 neutralizantes inibem fortemente a atividade angiogénica nas CP. O recetor de baixa afinidade do FCF-2, o *syndecan-1*, tem efeitos no crescimento, sobrevivência e adesão celular do tumor e pode modular a doença óssea associada ao mieloma. Esta molécula está presente nos plasmócitos dos doentes com MM e é considerada um marcador útil para detetar CP no sangue e na MO. Contudo, são necessários mais estudos acerca do significado clínico da ligação do FCF-2 às CP através do *syndecan-1* (8).

O FCH está associado à angiogénese, no MM. É uma citocina pleiotrópica, com capacidade de estimular o crescimento de diferentes células epiteliais e de induzir a formação de vasos sanguíneos. É produzido, normalmente, pelas células mesenquimais, como as CEMO e pode ainda promover a formação e ativação de osteoclastos (OC). O mRNA do FCH assim como o seu recetor (*c-met*) são expressos nas CP (7).

Níveis elevados de FCH têm sido encontrados no soro de doentes com MM, aquando do seu diagnóstico e preveem uma resposta diminuída à terapêutica e consequente diminuição da sobrevivência (7).

Os níveis dos fatores de crescimento referidos anteriormente são mais altos nas amostras de MO do que nas de sangue periférico (SP), o que significa que o ambiente da MO é o produtor maioritário destes fatores. Este dado ocorre especialmente para o fator FCF-2, cuja concentração, em alguns doentes, estava abaixo do limite de detecção no SP e alto na MO (7).

Os três fatores de crescimento referidos anteriormente têm atividade angiogénica, contudo, na maioria dos doentes com lesões extramedulares, nos quais a doença é mais invasiva, os valores de concentração desses fatores estavam nos mesmos intervalos que nos restantes doentes. Desta forma, é possível que no MM os fatores de crescimento referidos afetem a proliferação da doença e a localização das CP na MO, mas que não sejam responsáveis pela migração dos plasmócitos malignos para outros órgãos. Para além de todos os fatores de crescimento referidos anteriormente, a interação entre as diferentes células presentes no microambiente da MO é necessária para que a angiogénese ocorra (7).

2.2 - CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INTERAÇÃO COM OS PLASMÓCITOS

2.2.1. Células endoteliais

As CE tumorais diferem bastante das CE dos vasos sanguíneos saudáveis. Para além de apresentarem uma rápida proliferação, têm também diferentes perfis e níveis de moléculas de adesão. A sobrevivência destas células está completamente dependente da secreção de fatores de crescimento, produzidos não só pelo tumor, mas também pelo seu microambiente e da expressão de recetores para estes fatores. Para além destas características, é ainda importante referir o seu tamanho diferente do normal e a sua elevada permeabilidade. Esta última característica deve-se à presença de vesículas, de

As CE do MM expressam um marcador muito importante no processo de angiogénese, o RFCEV-2. É a este recetor que o FCEV produzido pelas CP se vai ligar induzindo, assim, a formação de novos vasos a partir de outros pré-existentes. As CP expressam ainda o CD133, um marcador de CEP envolvido na vasculogénese pré-natal (11).

As CP e as células inflamatórias secretam níveis elevados de FCEV, de FCF-2 e de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (FCI-1), os quais levam a que as CEP e as CEH da MO sejam recrutadas para o microambiente do tumor onde são, posteriormente, diferenciadas as CP e se formam os novos vasos sanguíneos (12).

A expressão elevada de $\beta 3$ -integrina, proteína importante na neovascularização, previne a apoptose das CE e permite a sua adesão à MEC, a sua proliferação, a migração e a capilarogénese (13).

A aquaporina 1, proteína que permite o transporte de água, é altamente expressa pelas CE do MM e é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, pelo extravasamento do plasma, pelo aumento da pressão intersticial, pela indução de hipóxia e pela produção de fator indutor de hipóxia 1 alfa (FIH-1 α) e de FCEV (9).

A via de sinalização parácrina, que permite a angiogénese e o crescimento do tumor, é mediada pelo FCEV e FCF-2. Os plasmócitos secretam FCEV, o qual induz a quimiotaxia e a proliferação das CE. Isto ocorre através do FCEVR-2 que é expresso, predominantemente, nas CE. Posteriormente, ocorre a sua autofosforilação e a da cinase que lhe está associada, a *extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK-2)* (14,15).

As quimiocinas são membros de uma vasta família de pequenas proteínas solúveis com capacidades de controlo da adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. No entanto, sabe-se que estão envolvidas noutras funções biológicas igualmente importantes, tais como a angiogénese, a hematopoiese, o desenvolvimento embriológico, o crescimento

tumoral e a metastização, entre outros. De acordo com o número e espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade N-terminal, as quimiocinas dividem-se em quatro subfamílias (CXC, CC, CX3C e C). As quimiocinas que pertencem à subfamília CXC e os seus respetivos recetores, também têm um papel importante na via de sinalização parácrina que ocorre entre os plasmócitos e as CE do MM. As CE da MO expressam e secretam uma grande quantidade de quimiocina desta subfamília. Várias linhagens de células do MM apresentam um padrão de expressão complexo de recetores de quimiocinas - *CXC-chemokine receptor* (CXCR) e *CC-chemokine receptor* (CCR) - que são responsáveis pela mediação da interação entre os plasmócitos e as CEMO, no microambiente da MO (15).

É importante referir que as CE do MM têm características que lhes permitem uma elevada expressão de marcadores endoteliais típicos (FCEVR-2, FCFR-2, endoglina/CD105 e caderina endotelial vascular), uma secreção elevada de metaloproteinases de matriz 2 e 9 e a regulação positiva de fatores angiogénicos tais como o FCEV, o FCF-2 e o fator de transformação do crescimento β (FTC- β) (9).

2.2.2. Células endoteliais progenitoras

Em 1997 surgiu a primeira evidência da existência de células circulantes, originadas na MO, com capacidade de se diferenciar em células da linhagem endotelial. Estas células foram designadas por CEPs (16).

As CEPs, têm sido definidas como células precursoras endoteliais que possuem propriedades semelhantes às dos angioblastos embrionários e que têm capacidade para circular, proliferar e se diferenciar em células endoteliais maduras, com a diferença de que ainda não adquiriram marcadores endoteliais maduros característicos e ainda não

formaram um lúmen. Sabe-se, também, que aderem ao endotélio nos locais de hipóxia/isquemia e participam na formação de novos vasos pela indução e modulação da vasculogénese e da angiogénese (17).

As CEPs são preservadas em nichos quiescentes da MO, cujo ambiente é de baixa tensão de oxigénio e alto conteúdo em fator derivado de células do estroma 1 (FDCE-1), uma quimiocina responsável por mantê-las nesse local. Em caso de trauma ou cicatrização de feridas associadas a hipóxia, as CEPs são estimuladas a deixar este nicho, a mobilizarem-se para o nicho proliferativo e a entrar na circulação. Deste modo, as CEPs migram em direção ao seu tecido alvo, são ativadas e, posteriormente, aderem às CEs do vaso e começam a migração transendotelial para futura remodelação vascular, atingindo o local de remodelação do vaso. Por fim, as CEPs diferenciam-se em CEs e/ou interagem com as CEs presentes. A diferenciação destas células envolve a adesão aos componentes da MEC, controlada por integrinas, a proliferação e a sobrevivência, a maturação e a aquisição do fenótipo endotelial. Estas células participam na manutenção da vasculatura através da indução da produção de fatores angiogénicos que estimulam a proliferação, a função e a sobrevivência das CEs (16).

2.2.3. Monócitos/macrófagos

Os macrófagos estão envolvidos no processo de angiogénese associado ao tumor. Verificou-se que existe uma relação entre a infiltração dos macrófagos, a vascularização e o prognóstico. Os macrófagos associados ao tumor acumulam-se em zonas de baixa vascularização, em hipóxia ou mesmo necrosadas. Estes, respondem à hipóxia experimental ao aumentar a libertação de FCEV, FCF-2 e de outros tipos de fatores, como o FNT- α e a uroquinase (18,19).

Para além do anteriormente descrito, os macrófagos ativados têm a capacidade de sintetizar e libertar a óxido nítrico-sintase induzida, que leva ao aumento do fluxo sanguíneo e à promoção da angiogénese. Por último, estas células, têm ainda a capacidade de recrutar plasmócitos (2).

Foi demonstrado que, através do mimetismo vasculogénico, os macrófagos da MO, em pacientes com MM, conseguem formar novos vasos, ao mesmo tempo que ocorre a progressão de plasmócitos tumorais. Estas células possuem finas expansões citoplasmáticas, permitindo obter um lúmen semelhante ao dos microvasos. Para além disto, conseguem ainda juntar as suas próprias expansões e ligam-se aos macrófagos que estão próximos para formar estruturas semelhantes às dos vasos sanguíneos. As biópsias efetuadas aos doentes com MM mostram vasos sanguíneos em mosaicos formados por CE, macrófagos semelhantes a CE e macrófagos normais. No entanto, os macrófagos retêm os seus marcadores CD14 e CD68, o que significa que estes não se transformam em CE, apenas se adaptam funcional, fenotípica e morfológicamente (2).

A partir de um estímulo sinérgico de FCEV e de FCF-2 secretados pelos plasmócitos, os macrófagos adquirem marcadores de CE e começam a comportar-se como CE da MO. O FCEV e o FCF-2 ligam-se aos seus recetores (FCEVR e FCFR) que são expressos na superfície dos macrófagos/monócitos. O recetor FCEV-1 está relacionado com a quimiotaxia dos macrófagos e com a vasculogénese. Contudo, a formação definitiva dos vasos está estritamente dependente do FCEVR-2. Por outro lado, o marcador FCF-2 e os FCFRs estão também envolvidos na vasculogénese (20).

No MM ativo, os plasmócitos secretam FCEV e FCF-2, o que induz os macrófagos a secretar os seus próprios marcadores FCEV e FCF-2 (2).

2.2.4. Mastócitos

A densidade dos mastócitos está estritamente correlacionada com a extensão da angiogénese que ocorre em tumores e na inflamação crónica. A acumulação destas células tem vindo a ser associada ao crescimento e à invasão tumoral (19).

Os mastócitos são recrutados através de vários mediadores produzidos pelas células tumorais, tais como o recetor do fator de crescimento de mastócitos, o FCF-2, o FCEV e o fator de crescimento derivado das plaquetas (FCDP). Estas células têm diversos fatores de angiogénese associados, tais como a triptase, a quimase, a heparina e a histamina. A heparina pode induzir a proliferação e a migração das CE; a histamina para além de ter um efeito angiogénico através dos recetores de histamina 1 e 2, contribui também para o aumento da permeabilidade dos novos microvasos formados durante a angiogénese, o que leva a que haja um aumento da libertação de proteínas plasmáticas, ocorrendo depósito de fibrina. Verificou-se ainda que, *in vivo*, os produtos de degradação da fibrina são angiogénicos (21).

A triptase é a protease predominante nos mastócitos e é responsável pela estimulação da divisão celular dos fibroblastos, das células do músculo liso e das células epiteliais. Para além disto, pode ainda ter um papel importante na neovascularização, ao favorecer a formação de estruturas capilares a partir de uma ação direta sobre as CE ou através da ativação de metaloproteinases e do ativador do plasminogénio. Foi também demonstrado que a parede dos novos vasos é revestida por mastócitos triptase positivos, que estão conectados através de um sistema de junção celular com as CE. Os mastócitos mantêm os seus marcadores e, por isso, podem ser considerados células que não se transdiferenciam em CE. Este comportamento dos mastócitos pode ser considerado um exemplo de mimetismo vasculogénico (21).

Verificou-se também que, em doentes com MM, a angiogénese na MO está altamente correlacionada com o número de mastócitos e, portanto, estes parâmetros aumentam simultaneamente nos doentes com MM ativo (22).

VII. 3 - GAMAPATIAS MONOCLONAIS

A maturação dos plasmócitos produtores de Igs ocorre quando há exposição destas células ao antígeno para o qual a Ig de superfície é dirigida. Contudo, nas patologias que envolvem os plasmócitos, deixa de ocorrer um controlo sobre este processo, podendo ser desencadeada uma gamapatia em que ocorre a produção excessiva de Igs monoclonais pelas CP. Na Figura 4 estão representados os perfis eletroforéticos de proteínas correspondentes a gamapatias monoclonais e policlonais (23).

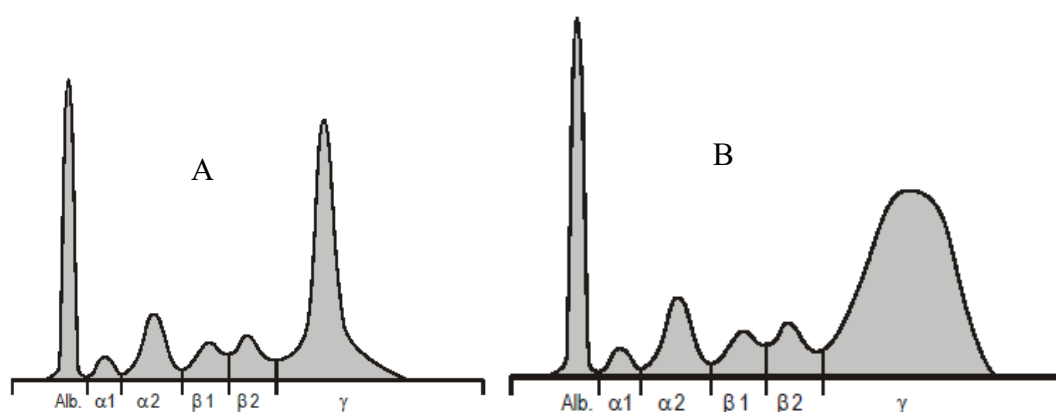


Figura 4 - Perfil electroforético de proteínas totais séricas, evidenciando os picos monoclonal (A) e policlonal (B) nas frações correspondentes às γ -globulinas. Retirado de (24).

Na gamapatia monoclonal (GM) as Igs ou os seus fragmentos são de um só clone de linfócitos B ou plasmócitos. Esta situação pode ser um processo patológico ou não. Uma parte significativa das gamapatias monoclonais identificadas na eletroforese sérica

não são malignas e são designadas por gamopatias monoclonais de significado indeterminado (GMSI). Contudo, existem algumas GMs que constituem formas progressivas de situações malignas, como é o caso do MM (23).

Dentro do espectro de condições hematológicas em que estamos na presença de uma GM temos a GMSI, os diferentes tipos de MM, os plasmocitomas, a macroglobulinemia de Waldenström, a leucemia linfocítica crónica e ainda outros linfomas de baixo grau (25).

3.1 GAMAPATIA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INDETERMINADO

A GMSI é a alteração mais comum que envolve os plasmócitos, ocorrendo em cerca de 3% da população com mais de 50 anos de idade e em cerca de 51% na população com gamopatias monoclonais, como mostra a figura 5. Esta situação é considerada pré-maligna, uma vez que poderá evoluir para MM. Esta progressão ocorre a uma taxa de 1% por ano (26,27).

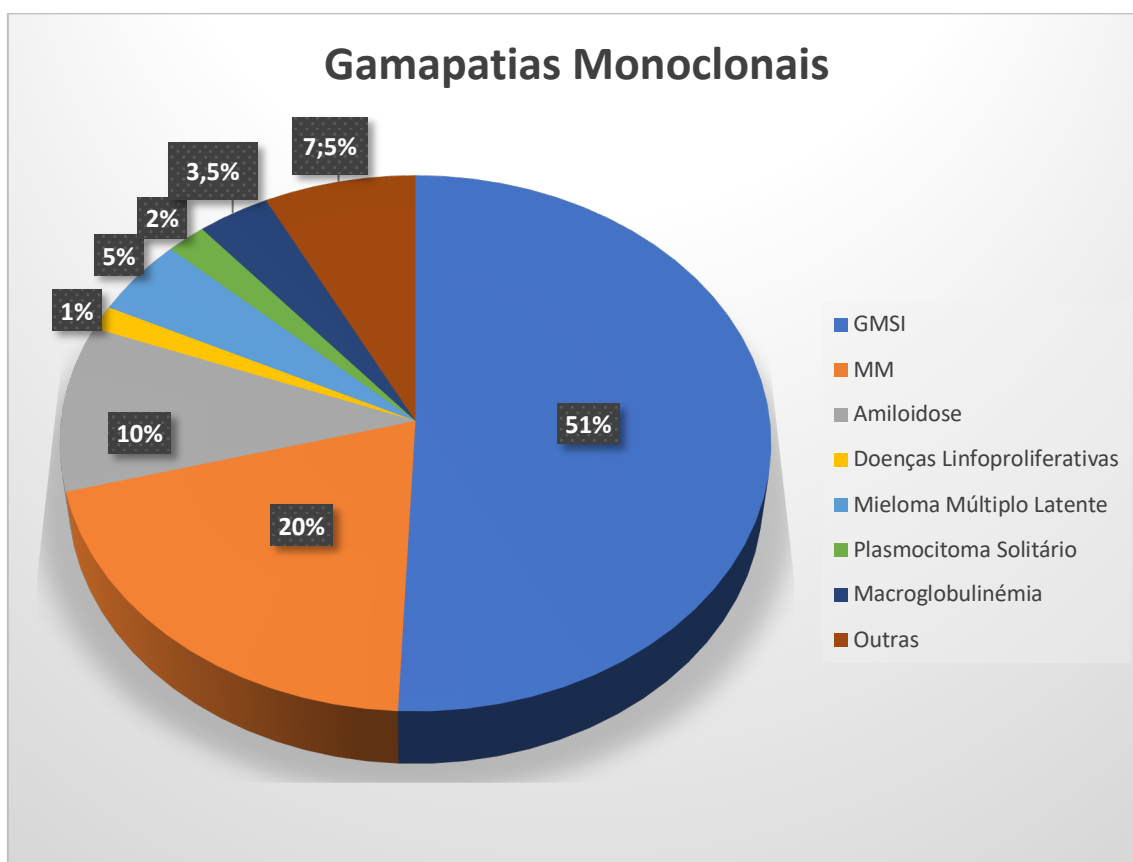


Figura 5 - Distribuição das gamopatias monoclonais diagnosticadas na Clínica Mayo durante 2011. O mieloma múltiplo (MM) representa 20% dos casos diagnosticados naquela clínica, precedido apenas pela gamapatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) com uma percentagem de 51%. A amiloidose primária representa 10% dos casos diagnosticadas, seguida das doenças linfoproliferativas, do mieloma múltiplo latente, do plasmocitoma solitário ou extramedular e da macroglobulinemia de Waldenström. Adaptado de (27).

Na GMSI os níveis de proteína monoclonal ou paraproteína (PM) são inferiores a 3 g/dL, há menos de 10% de plasmócitos na MO e não há evidência de danos nos órgãos alvo (28).

Durante a progressão da GMSI para o MM ocorre a angiogénese. O aumento deste fenómeno está relacionado com a atividade da doença, com o grau de envolvimento medular e com a capacidade proliferativa dos plasmócitos. A GMSI pode progredir para uma fase intermédia, também assintomática designada por mieloma múltiplo indolente (MMI) e evoluir para MM sintomático (2).

Na transição da GMSI para o MM ocorrem alterações na interação com o microambiente. No MM, há uma regulação positiva da expressão do *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)* nos osteoblastos e uma diminuição na produção de osteoprotegerina (OPG). Desta forma, ocorre um aumento da proporção de RANKL/OPG, que leva à ativação dos OC e ao desenvolvimento de lesões líticas. Embora as lesões ósseas não sejam observadas na GMSI, verificou-se que a relação RANK-L/OPG é maior em indivíduos com GMSI quando comparado com pessoas saudáveis, o que aumenta o risco de ocorrerem fraturas. Para além destas modificações, os eventos oncogénicos, a angiogénese na MO e as citocinas relacionadas com a doença óssea do mieloma desempenham um papel importante na progressão da GMSI para MM (2).

3.2 MIELOMA MÚLTIPLO

Em 1848 foi feita a primeira descrição do MM, sendo esta doença caracterizada pela proliferação de células malignas formadoras de anticorpos (CP ou plasmócitos) e pela subsequente abundância de anticorpos não funcionais – Proteínas M. Como consequência, ocorre um desequilíbrio na remodelação óssea com o aumento da reabsorção e a diminuição da formação do osso, que representa a principal característica na maioria dos doentes (2).

Na Europa, o MM tem uma incidência de 4,5 a 6 por cada 100 000 indivíduos e por ano, com uma média de idade entre os 63 e os 70 anos e com sobrevivência média de 3 a 4 anos. A taxa de mortalidade é de 4.1 em cada 100 000 indivíduos por ano (29).

Os plasmócitos normais são encontrados na MO e são uma parte importante do sistema imunológico. Este é composto por vários tipos de células, as quais são responsáveis por combater infeções e outras doenças. O principal tipo de células do sistema imunológico, são os linfócitos (30).

Na presença de uma infeção, os linfócitos B diferenciam-se em CP que, por sua vez, produzem Igs que vão atuar diretamente nos antígenos. Existem diversas classes de Igs (Ig G, Ig M, Ig A, Ig D e Ig E) (30).

Os linfócitos encontram-se em várias áreas do organismo, como nos nódulos linfáticos, na MO, nos intestinos e na corrente sanguínea. No entanto, as CP são encontradas principalmente na MO, sendo esta um tecido mole encontrado no interior dos ossos. Na Figura 6, é possível ver os plasmócitos presentes na MO de um doente com MM (31).

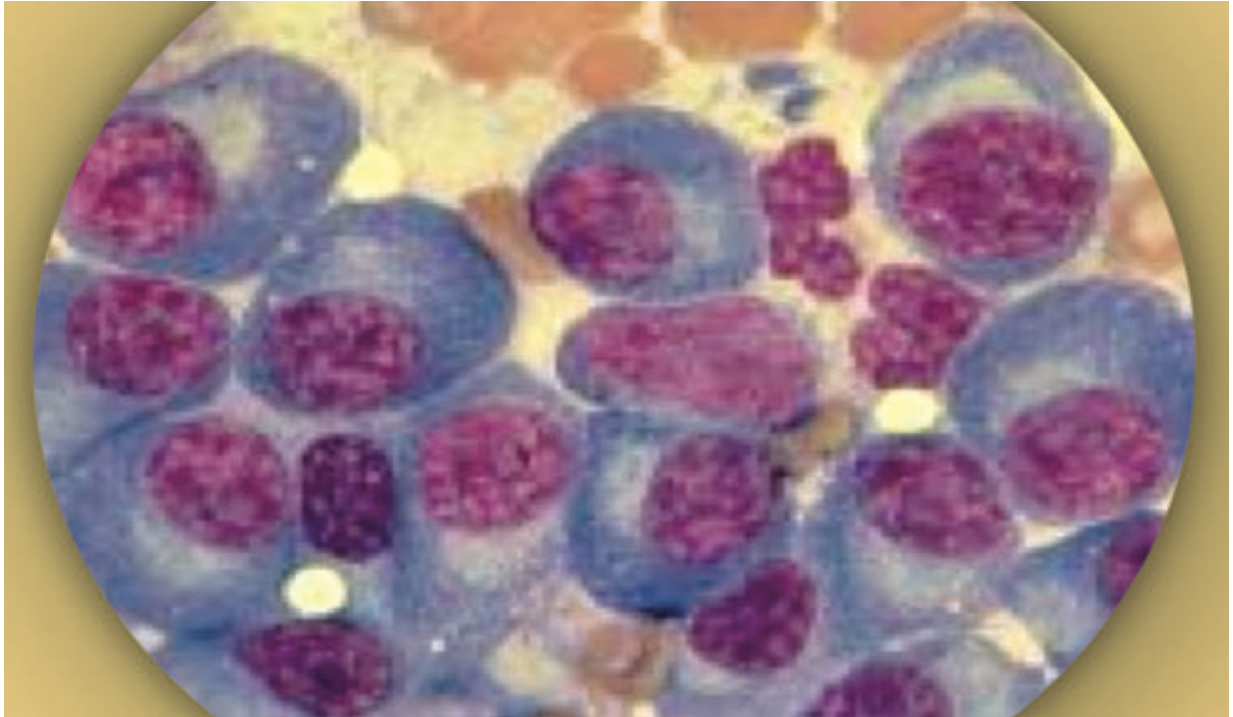


Figura 6. Plasmócitos presentes na medula óssea de um doente com mieloma múltiplo. Retirado de (31).

As dores associadas à destruição óssea, a anemia, a hipercalcémia e a insuficiência renal são as principais manifestações do MM. Estas manifestações correspondem aos critérios *CRAB* - *calcium elevation* (*C*), *renal insufficiency* (*R*), *anemia* (*A*), *bone disease* (*B*) – a partir dos quais se considera a necessidade de tratamento (16,28).

As interações fisiopatológicas das CP com o microambiente da MO estão associadas à progressão da doença e à neovascularização. Estas interações são suportadas por mecanismos autócrinos e parácrinos, que ativam várias vias de sinalização que, consequentemente, interferem com a apoptose, a sobrevivência, a proliferação, a invasão tumoral e a angiogénese (4).

3.2.1 Microambiente medular no mieloma múltiplo

A MO é constituída por dois compartimentos, um celular e um não celular. No compartimento celular estão presentes as CEH e as não hematopoéticas, as CEMO. Esta população é formada por osteoblastos, CE e células estaminais mesenquimais, entre outras. As células estaminais mesenquimais podem ainda diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (32).

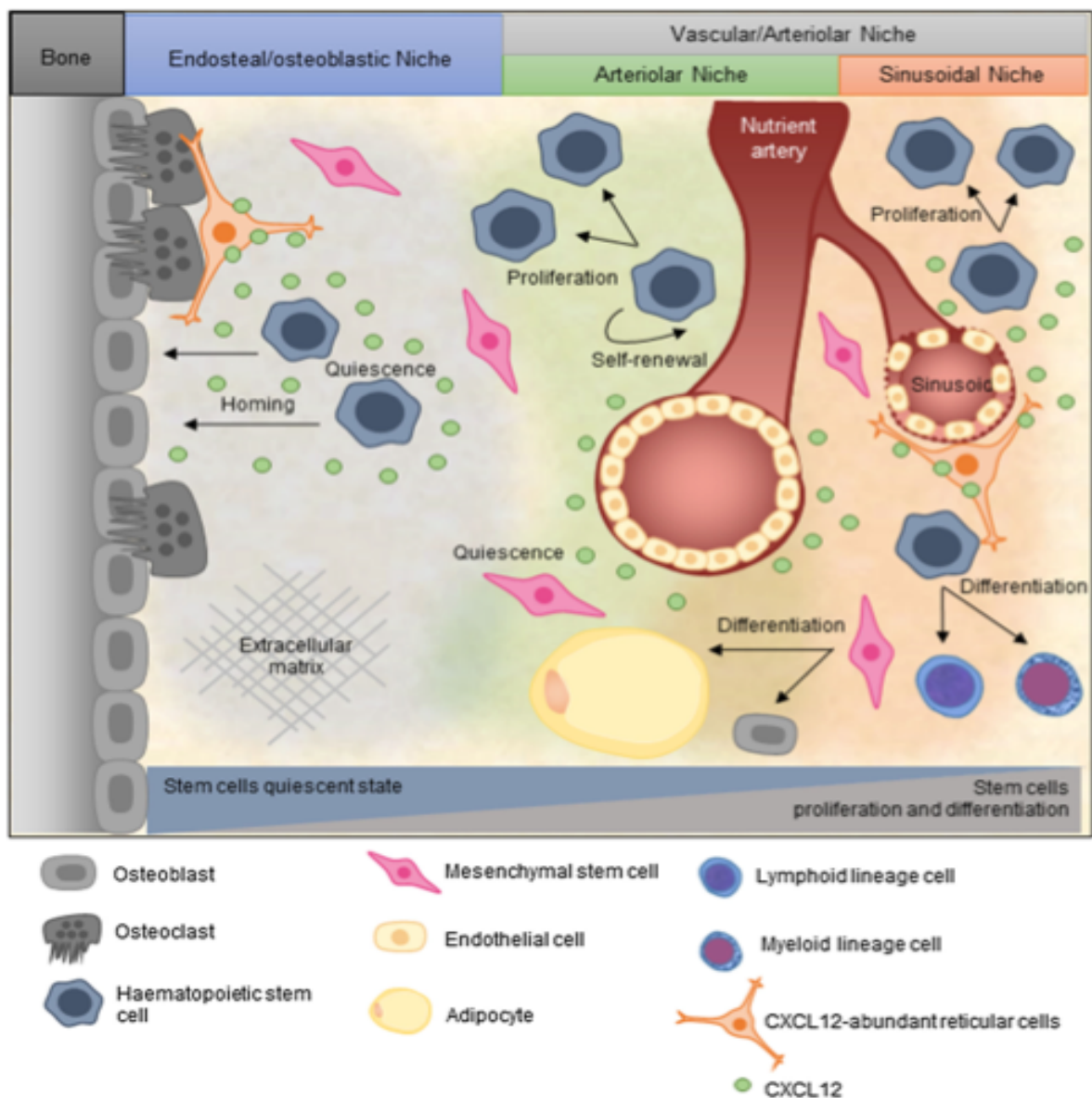


Figura 7 - Representação esquemática do microambiente da medula óssea e respectivos nichos. Retirado de (31)

O ambiente da MO é rico em diferentes populações de células e com vários microambientes distintos. Na Figura 7 é possível distinguir um nicho endosteal/osteoblástico e um nicho vascular/arteriolar. Estes nichos são responsáveis por regular as células que abrigam (16).

O nicho endosteal localiza-se na parte interna das cavidades ósseas, junto ao endóstio, a camada que reveste internamente o osso. Os osteoblastos são o principal componente deste nicho, sendo que estas células são responsáveis por manter as CEH no estado quiescente, através da regulação negativa da proliferação e diferenciação das CEH e da indução da adesão óssea através da secreção da Ang-1. As CEH alojam-se no endóstio da MO e, em caso de dano, deixam o nicho endosteal e migram para o nicho vascular onde ocorre a sua proliferação (33).

O nicho vascular/arteriolar é constituído principalmente por CE. Este nicho é dividido em nicho arteriolar quiescente e nicho sinusoidal. O fornecimento de sangue da MO é feito de forma diferente quando comparado com o restante sistema circulatório. É através da artéria nutritiva, que entra através do córtex (periferia óssea), que é feito o fornecimento sanguíneo dos sinusóides, ou seja, dos capilares altamente permeáveis formados por CE fenestradas intercaladas por camadas de membrana basal descontínua (33).

O compartimento não celular é constituído pela MEC e pelo meio líquido adjacente, onde se podem encontrar citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (33).

A MEC é a rede constituída por quatro grandes classes de macromoléculas: colagénios, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas adesivas. Estas moléculas são responsáveis por proporcionar um suporte físico para sustentar a estrutura tecidual, criando espaço para o transporte de moléculas. É a partir da interação entre as

células e a MEC que o crescimento, a morte, a diferenciação e a mobilidade das células são determinados (34).

Durante o processo de invasão tumoral ocorre a interação entre as células tumorais, a membrana basal e a MEC. Esta interação pode ser dividida em três etapas:

1- Degradação da MEC por enzimas secretadas pelas células tumorais (metaloproteinases, collagenases, plasmina, catepsinas, glicosidases e heparanases). Estas enzimas levam à desorganização e à fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal;

2- Adesão da célula tumoral, via recetores específicos da superfície celular, que geralmente interagem com componentes da MEC;

3- Locomoção da célula tumoral na região da MEC previamente degradada pelas enzimas (35).

No MM, o *homing* das CP na MO ocorre devido à adesão seletiva destas às CE da MO, à migração transendotelial e à adesão às CEMO. A adesão das CP às CEMO através da integrina $\alpha 4\beta 1$ e da *vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)*, induz a secreção parácrina de IL-6, IL-1 β , IL-11, FNTs, FTC- β e o RANKL, pelas CEMO. A produção de IL-6 pelas CEMO, que ocorre através da ativação do NF- κ B, aciona a proliferação das CP e protege-as da apoptose induzida pela dexametasona. A ativação do NF- κ B, um fator de transcrição, é responsável pela produção de outros fatores de crescimento e de moléculas de adesão, tais como o FCEV, a *VCAM-1* e a selectina-E, pelas CEMO e pelas CP (36).

Todas as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento referidos anteriormente são responsáveis por estimular a osteoclastogénese e a comunicação entre as células presentes no microambiente da MO (37) .

Os OC são células multinucleadas que têm como função efetuar a reabsorção óssea, sendo esta controlada pelos osteoblastos. A regulação da diferenciação destas células é efetuada por diferentes fatores, tais como o RANKL, a OPG produzida pelos osteoblastos, a proteína inflamatória dos macrófagos 1α (PIM-1 α), a IL-6 e a IL-3 (38).

O desequilíbrio na razão *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (RANK)/OPG, devido ao aumento da produção do RANKL e à diminuição da produção da OPG, promove o aumento da osteoclastogénese. O RANKL é secretado quando as CP aderem às CEMO ligando-se, posteriormente, ao seu recetor (RANK) nas células progenitoras dos OC. A ligação ao recetor leva à estimulação da atividade e da diferenciação dos OC e, consequentemente, à reabsorção óssea. Por outro lado, a osteoblastogénese encontra-se diminuída no MM (39).

O microambiente medular representa ainda o substrato para a angiogénese e, por isso, é considerado como um dos fatores mais importantes para a progressão da doença. As interações entre os componentes do microambiente permitem que ocorra a proliferação, a migração e a sobrevivência das CP, assim como a resistência aos fármacos e a instalação e progressão da doença óssea (2).

3.2.2 Biomarcadores no mieloma múltiplo

Segundo o “National Cancer Institute”, um biomarcador é uma molécula encontrada no sangue e noutros fluidos corporais ou tecidos, que pode servir como indicador para um processo normal ou anormal, uma condição, ou uma doença (40).

Em 1960, os investigadores do MM começaram a identificar biomarcadores que previam a sobrevivência, dentro dos quais se destaca a hemoglobina, o cálcio sérico, a creatinina sérica e a gravidade da lesão óssea (40).

Em 1975, Durie e Salmon introduziram um sistema de teste que usava a proteína M, a hemoglobina, o cálcio e uma série de lesões ósseas para prever a carga tumoral das células do MM. Na década de 80, a β_2 microglobulina (β_2 M) sérica foi considerada um marcador de prognóstico simples, ainda que confiável, para a classificação da doença (40).

Em 2005, foi criado um Sistema Internacional de Estadiamento (SIE). De acordo com este, os atuais critérios de estadiamento do MM baseiam-se no doseamento dos níveis séricos de albumina e de β_2 M. O Estadiamento do MM compreende três grupos com prognósticos distintos (41).

Tabela 1. Estádios do mieloma múltiplo e respectivos prognósticos.

Estádio do Mieloma Múltiplo	Critérios	Prognóstico (Sobrevivência Global Mediana)
I	β_2 M < 3,5 mg/L e albumina \geq 3,5 g/dL	62 meses
II	Sem critérios para estágio I ou II	44 meses
III	β_2 M \geq 5,5 mg/L	29 meses

β_2 M - β_2 microglobulina

Apesar dos biomarcadores disponíveis, são necessários indicadores mais sensíveis para tentar perceber de que forma ocorre a progressão de um estado assintomático para o MM sintomático, uma vez que este fenómeno ainda é imprevisível devido à heterogeneidade da doença. Para além do que foi referido anteriormente, os novos biomarcadores podem ajudar a adaptar a terapêutica a cada paciente e a prever a resposta ao tratamento (40).

As CEP têm vindo a ser alvo de estudos de forma a constituírem um novo biomarcador para o MM, uma vez que a sua origem é a mesma das CEH (42).

Em 2005, um estudo mostrou que os níveis de CEP eram mais altos no MM do que em controlos saudáveis, sendo que estes valores estavam correlacionados com os níveis de paraproteína M e de $\beta 2M$, o que sugere que as CEP podem ser um biomarcador periférico da progressão do MM (42).

Verificou-se que, mesmo em estádios iniciais do MM, a mobilização e a proliferação de CEPs na MO são substanciais, em comparação com os grupos saudáveis e que as CEPs já estão aumentadas antes da doença ativa (42).

Verificou-se, também, que diferentes níveis de CEPs estão associados a diferentes respostas à terapia e, portanto, estes podem ser utilizados para adequar o tratamento a uma determinada situação e ainda para prever qual a resposta dos doentes à terapêutica (42).

3.2.3 Diagnóstico

Em 2014, os critérios de diagnóstico de GMSI, MMI e do MM foram atualizados pelo *International Myeloma Working Group* (IMWG). Para que seja considerado MM sintomático e que se tenha de recorrer à terapêutica, é necessário que se verifique uma plasmocitose medular clonal igual ou superior a 10% ou a presença de plasmocitoma confirmado por biópsia e, pelo menos, um ou mais dos critérios CRAB e eventos definidores de mieloma:

- Critérios CRAB:
 - Hipercalemia: cálcio sérico superior ao valor normal em mais de 1 mg/dL ou > 11 mg/dL;
 - Insuficiência renal com clearance de creatinina < 40 mL por minuto ou creatinina sérica > 2 mg/dL;
 - Anemia com hemoglobina inferior ao valor normal em mais do que 20 g/L ou hemoglobina < 100 g/L;
 - Presença de lesões ósseas.
- Presença de um ou mais dos biomarcadores malignos (60% ou mais plasmócitos no exame de medula óssea, taxa de cadeias leves livres séricas ≥ 100 e/ou mais do que uma lesão focal na ressonância magnética (RM) que seja de pelo menos 5 mm) (28).

3.2.3.1. Clínico

Os sintomas do MM variam muito de doente para doente e para além de não serem específicos desta patologia, podem também não estar presentes nos estádios iniciais da doença (43).

Os principais sintomas são: as dores e fraturas ósseas, que ocorrem devido ao aumento da atividade dos OCs e à diminuição da atividade dos osteoblastos. As lesões osteolíticas são localizadas, principalmente, nos ossos longos e na pélvis, provocam dor e aumentam o risco de fraturas, especialmente nas vértebras; a hipercalemia, que ocorre devido ao aumento dos níveis de cálcio em circulação, pode provocar confusão, sonolência, sede e náuseas; problemas renais, que ocorrem devido ao excesso de PM secretada pelas células de mieloma e devido ao aumento de cálcio em circulação. O rim

funciona excessivamente e, por isso, a sua capacidade de filtração do sangue fica diminuída, contribuindo para a sua falência e podendo evoluir, posteriormente, para insuficiência renal (43).

Outros sintomas comuns, mas menos específicos, são a anemia e o cansaço, as infecções recorrentes, o sangramento e a perda de peso. Estes sintomas resultam do aumento significativo da proliferação de células malignas na MO, que afeta a produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (44).

3.2.3.2. Hematológico

A realização de um hemograma completo permite a contagem das células sanguíneas. Nestes doentes é possível encontrar uma diminuição do número de plaquetas, glóbulos brancos e, principalmente de glóbulos vermelhos. A velocidade de sedimentação encontra-se anormalmente elevada devido à grande concentração de PM, que promove a aglutinação dos eritrócitos, levando a que a deposição destas células ocorra muito rapidamente (45).

Deve ser feita uma punção aspirativa da MO, com mielograma e, eventualmente, uma biopsia óssea. O mielograma permite observar uma infiltração por plasmócitos anormais e permite o estudo das características das células. O estudo do MM engloba também a imunofenotipagem e a citogenética (45).

As CP podem conter vacúolos citoplasmáticos, grânulos, cristais e inclusões. Os corpos de Russell são múltiplas inclusões esféricas citoplasmáticas redondas que por vezes são vistas nos aspirados da MO do MM. Estes vacúolos são compostos por Igs dentro de estruturas vesiculares derivadas do retículo endoplasmático rugoso. As CP que as contêm denominam-se por células Mott (46).

Níveis elevados de Ig monoclonais promovem a formação de *rouleaux* de glóbulos vermelhos no SP, tal como o representado na figura 8 (46).

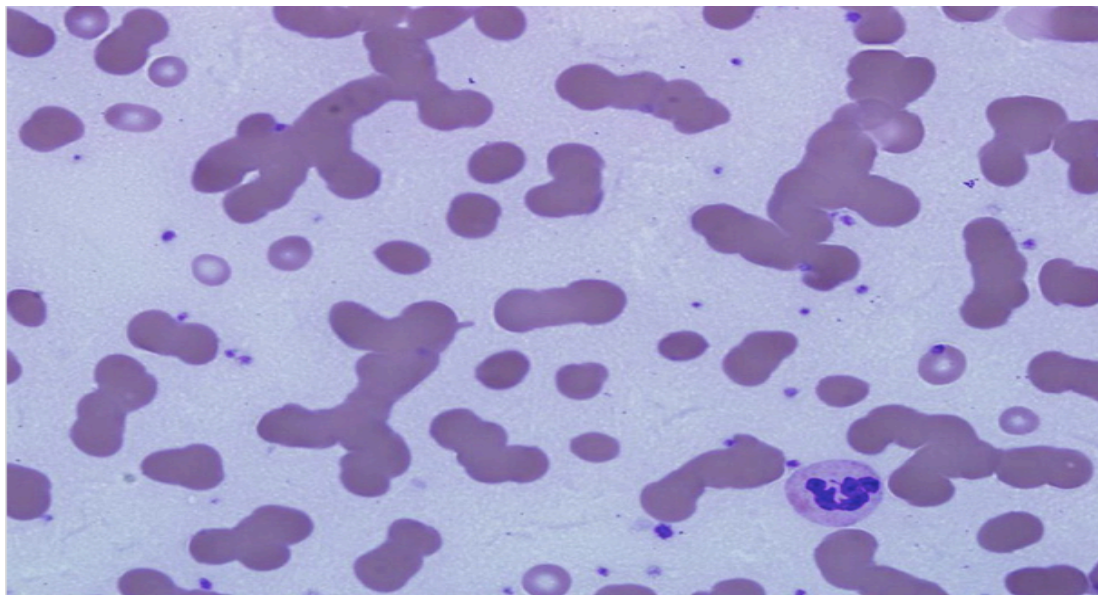


Figura 8 – Formação de “rouleaux” de glóbulos vermelhos em sangue periférico de doentes com mieloma múltiplo. Retirado de (46).

3.2.3.3. Bioquímico

Através de testes bioquímicos são determinados os níveis de ureia, creatinina, albumina, cálcio e $\beta 2M$. Nestes doentes, os níveis de ureia e creatinina poderão estar aumentados, o que indica um mau funcionamento dos rins. Em situações em que a albumina apresenta níveis baixos e o cálcio níveis sanguíneos elevados, podemos estar na presença de um estado avançado do MM. A $\beta 2M$ é produzida pelas células malignas, pelo que níveis elevados desta proteína sugerem um estadio de doença avançado e, consequentemente, um mau prognóstico (47).

A eletroforese de proteínas séricas é utilizada para detetar a presença de proteína M secretada pelas células de mieloma (47).

3.2.3.4. *Imunológico*

A imunofixação permite identificar o tipo de anticorpos anormais presentes no sangue (geralmente IgG ou IgA) e ajuda na classificação da doença. A imunofixação pode ser feita a partir de uma amostra de soro ou de urina (24).

A determinação dos níveis séricos das cadeias leves livres (CLL) das Ig permite determinar a razão entre as cadeias leves κ e λ . Na ausência de doença a cadeia Kappa (κ) e lambda (λ) encontram-se em quantidades relativamente semelhantes e por isso estarão numa razão de 1 para 1. Desta forma, níveis diferentes do normal e razões diferentes das CLL sugerem a eventual presença de MM (48).

3.2.3.5. *Citogenético*

A análise citogenética avalia o número e a aparência dos cromossomos em células do MM, para identificar alterações no ADN, nomeadamente deleções ou translocações que acontecem nesta patologia. Certas alterações no ADN podem indicar a agressividade da doença (50).

Os testes mais comuns são a análise do cariótipo, que permite a visualização e quantificação do número de cromossomas, e a *fluorescence in situ hybridization (FISH)*, que é utilizada para detetar e/ou localizar determinadas sequências no ADN. A FISH pode ser realizada recorrendo a amostras de sangue ou a amostras de MO (48).

As alterações genéticas mais comuns nos doentes com MM são translocações e deleções, nomeadamente translocações na região correspondente ao gene da IgH no cromossoma 14q32, deleções e translocações ao nível do cromossoma 13 e deleção do cromossoma 17p. Consoante a alteração genética diagnosticada, o prognóstico também é diferente (31).

3.2.3.6. *Imagiológico*

O procedimento que é considerado *standard* para avaliar as lesões ósseas líticas corresponde à tomografia computadorizada de baixa dose e de corpo inteiro. Caso não seja possível efetuar este procedimento, pode recorrer-se à radiografia. Sempre que haja probabilidade de que esteja presente a compressão da medula deve ser efetuada a RM (28).

3.2.4 Terapêutica do mieloma múltiplo baseada na angiogénese

3.2.4.1 *Terapêutica utilizada atualmente*

A relevância da neovascularização no MM levou ao desenvolvimento e exploração de fármacos direcionados à vasculatura. Vários fármacos usados no tratamento do MM, como o bortezomib, a talidomida e a lenalidomida demonstraram ter capacidade anti-angiogénica (24).

A talidomida atua diretamente no tumor, ao possuir um efeito antiangiogénico e ainda por modular a via de sinalização do TNF- α , através de interferências diretas ou indiretas no microambiente do tumor e por reduzir a secreção de FCF-2, de FCEV e de IL-6 nas CEMO. Esta molécula é, também, responsável por estimular a ativação e a expansão das células T e aumentar a citotoxicidade mediada pelas células *natural killer* (NK), através de um efeito direto nas células T, com o consequente aumento da secreção de IL-2 e de interferão γ (IFN- γ). Para além do anteriormente referido, a talidomida interfere, também, com a atividade do NF- κ B através do bloqueio da ligação ao DNA e por suprimir a atividade da cinase I κ B, levando a que deixem de ser produzidas as citocinas inflamatórias normais (49).

A talidomida é também responsável por perturbar a interação que há entre as CP e todas as outras células presentes na MO. O tratamento com esta molécula está associado a sedação, fadiga, obstipação, erupção cutânea, trombose venosa profunda (8 a 23% dos doentes) e neuropatia periférica (12-17% dos doentes). O risco de ocorrer trombose venosa profunda é maior quando o tratamento com talidomida é combinado com a quimioterapia, especialmente com a doxorrubicina. Por esta razão, é obrigatório fazer a profilaxia anticoagulante com heparina de baixo peso molecular (HBPM) ou aspirina (50).

A lenalidomida, um derivado da talidomida, é um fármaco imunomodulador de segunda geração com múltiplos mecanismos de ação no MM (51).

Os mecanismos de ação da lenalidomida, representados na Figura 9, incluem propriedades antineoplásicas, antiangiogénicas, pro-eritropoiéticas e imunomoduladoras. Especificamente, a lenalidomida inibe a proliferação de determinadas células tumorais hematopoiéticas (incluindo as CP tumorais do MM), aumenta a imunidade mediada por células T e células NK, inibe a angiogénese mediante o bloqueio da migração e da adesão das CE e a formação de microvasos, aumenta a produção da hemoglobina fetal pelas CEH CD34⁺ e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (p. ex., TNF- α e IL-6) pelos monócitos (52).

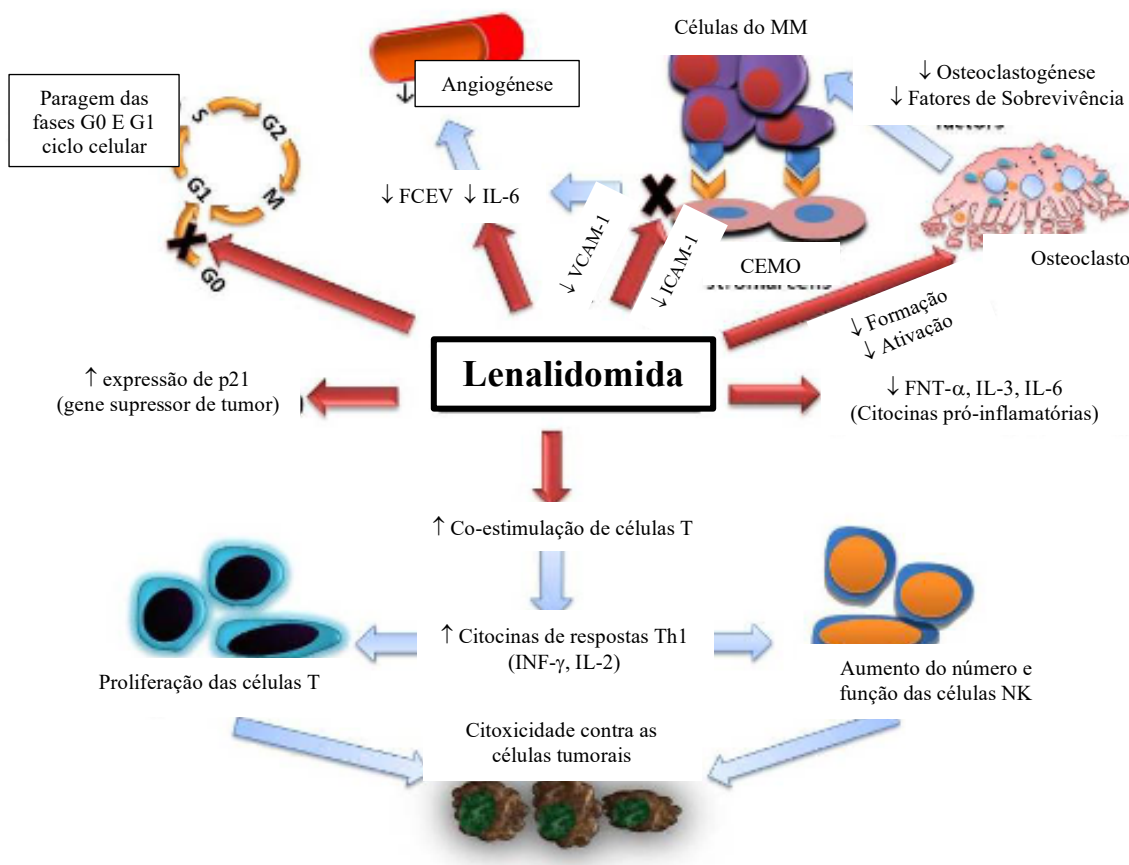


Figura 9 – Mecanismos de ação da lenalidomida. Fator de crescimento endotelial vascular (FCEV); fator de necrose tumoral α (FNT- α); interleucina (IL); “natural killer” (NK); mieloma múltiplo (MM); “vascular cell adhesion molecule 1” (VCAM-1); “intercellular adhesion molecule 1” (ICAM-1); interferão γ (IFN- γ); células do estroma da medula óssea (CEMO). Adaptado de (51).

A pomalidomida é o imunomodulador mais potente usado no MM, sendo cem vezes mais forte que a talidomida e dez vezes mais forte que a lenalidomida. Esta molécula tem resultados favoráveis em situações onde existe resistência ao bortezomib e à lenalidomida. O seu mecanismo de ação consiste na inibição da angiogénese ao ter como alvo o FCEV e o FIH-1 α . Em doentes com MM em estado de recidiva ou refratário, a pomalidomida é eficaz quando administrada sozinha ou em combinação com dexametasona, mesmo em doentes que estejam no estado refratário e já tenham sido submetidos à terapêutica com outro imunomodulador e/ou com o bortezomib (53).

O bortezomib é um inibidor dos proteossomas. É especificamente concebido para inibir a atividade do tipo quimiotripsina do proteossoma 26S nas células dos mamíferos. O proteossoma é uma protease dependente de ATP usada para destruir proteínas danificadas ou com erros de síntese, que são marcadas para degradação através da ligação à ubiquitina. O mecanismo de ação da via proteossoma ubiquitina tem um papel essencial na regulação do *turnover* de proteínas específicas, mantendo assim a homeostasia nas células. A inibição do proteossoma 26S evita a proteólise e afeta múltiplos sinais de cascata dentro da célula, resultando na morte de células cancerígenas (54).

A degradação de proteínas, anormalmente configuradas e danificadas, pelo proteossoma ocorre quando a subunidade reguladora 19S da protease 26S reconhece as proteínas poliubiquitinadas e, posteriormente, procede à sua hidrólise em pequenos polipéptidos. Para além da eliminação destas proteínas, o proteossoma também regula alguns processos celulares chave, como por exemplo a modulação de fatores de transcrição, tais como o NF- κ B, a progressão do ciclo celular, a inflamação, a vigilância imunitária, o controlo do crescimento e a apoptose (2).

Em células do MM, o bortezomib inibe a atividade do NF- κ B. Esta molécula é o principal fator de transcrição que medeia a expressão de muitas proteínas, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular. A ativação deste fator é necessária para muitos aspetos da tumorigénese, incluindo o crescimento e sobrevivência celular, a angiogénese, as interações célula-célula, e a metastização. No MM, o bortezomib afeta a capacidade das CP para interagir com o microambiente da MO. A sua atividade é regulada através da associação com a família de proteínas I κ B. A fosforilação da proteína I κ B, pela cinase I κ B, é desencadeada a partir de vários estímulos tais como as citocinas TNF- α e IL-1 β . Após a sua fosforilação, a proteína I κ B é, posteriormente, poliubiquitinada por enzimas específicas e degradada pelo proteossoma 26S. A expressão de moléculas de

adesão, tais como a VCAM-1, em células do MM e CEMO é também regulada pelo NF- κ B. Desta forma, a inibição pelo bortezomib, reduz a expressão destas moléculas de adesão, aumentando assim a suscetibilidade das células do MM aos agentes terapêuticos no contexto do meio da MO. Outro aspeto importante é o facto de a via de ativação do NF- κ B mediar a indução da transcrição e a secreção de IL-6 pelas CEMO o que, por sua vez, leva ao aumento da secreção de outras citocinas, tais como o FCEV, pelos plasmócitos. Para além disto, a aderência das células do MM às CEMO, desencadeia a secreção de IL-6 através da via de ativação do NF- κ B associada a um aumento do crescimento das células do MM. O Bortezomib bloqueia a adesão das células do MM induzida pela secreção de IL-6 pelas CEMO. Como resultado da inibição da atividade do proteossoma, ocorre a acumulação de proteínas ubiquitadas com uma conformação anormal, o que faz com que o retículo endoplasmático entre em *stress*, levando as células do MM à apoptose (2,36).

Os inibidores do proteossoma têm uma grande atividade contra as CE mitóticas e, portanto, selecionam os vasos sanguíneos desenvolvidos anormalmente e que estão associados ao crescimento tumoral. Desta forma, o bortezomib inibe a proliferação das CE do MM. Para além disto, o bortezomib inibe a reparação do DNA, o que permite que haja sensibilidade aos agentes quimioterapêuticos que interferem com o DNA, tais como a doxorrubicina e o melfalano. O bortezomib é ainda responsável pela regulação negativa da fosforilação da caveolina-1 em tirosina, a qual é necessária para que ocorra a migração das CP do MM, mediada pelo VEGF e, também, pelo impedimento da fosforilação da caveolina-1 induzida pelo VEGF nas CE. Por fim, esta molécula inibe também a transcrição de moléculas de adesão importantes, tais como a *VCAM-1* e a selectina E. Os efeitos secundários mais frequentes desta molécula incluem neuropatia periférica, sintomas gastrointestinais e trombocitopenia (2,36).

Foi demonstrado que o bortezomib quando associado à dexametasona, apresenta um aumento dos indicadores da sobrevivência livre de progressão de doença e da sobrevivência global, quando comparado com o tratamento apenas com a dexametasona (55).

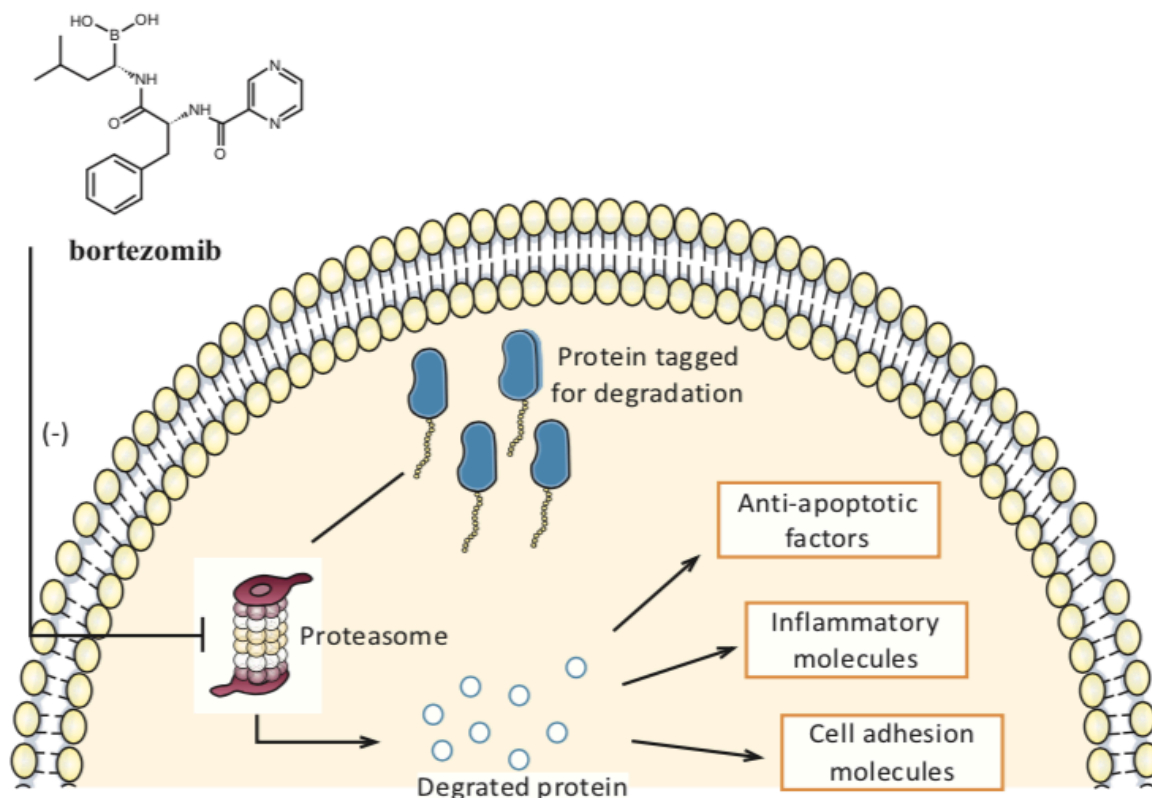


Figura 10 – Mecanismo de ação do bortezomib. Retirado de (49).

3.2.4.2. Fármacos em desenvolvimento

Tendo em conta que o FCEV é um fator crucial para a angiogénese no MM e que participa no crescimento das CE, na migração das CP e das CEP, ele constitui um alvo importante para direcionar a terapêutica. Neste sentido, foram feitos testes a uma molécula, o aflibercept, que se liga ao FCEV, inibindo a sua ligação aos recetores FCEV 1 e 2. Verificou-se que esta molécula é eficaz ao interferir com a diferenciação e a mobilização das CEP e, portanto, com o crescimento do tumor. Apesar de não ter impedido o crescimento do tumor, a sobrevida destes doentes melhorou (56).

O RLYE liga-se ao recetor 2 do FCEV, impedido a ligação deste ao FCEV e inibe o crescimento do tumor. Embora este fármaco não tenha sido testado em humanos, é uma boa perspetiva para futuras investigações (57).

O pazopanib constitui um inibidor dos recetores 1, 2 e 3 do FCEV. Este fármaco bloqueia a proliferação de CEs, bem como o crescimento, sobrevivência e migração das CPs. Além disso, o pazopanib reduz a capacidade de adesão das CPs e das CEs *in vitro*, o que deixa a sugestão de que a capacidade de adesão de CEPs também pode ser afetada. Embora haja uma maior sobrevivência, redução do crescimento do tumor e da angiogénese, os tumores recuperaram rapidamente após o término do tratamento (58).

Mais recentemente, demonstrou-se que o uso do anticorpo DC101 impediu a mobilização de CEPs e retardou a progressão do tumor quando aplicado em fases iniciais de MM e de GMSI, mas foi ineficaz quando usado durante o MM em fase mais adiantada. Este facto suporta a dependência inicial que as CP têm nos novos vasos obtidos a partir das CEPs (59).

O CXCL12 e seu recetor CXCR4 desempenham um papel vital na mobilização das CEPs. O fármaco antagonista do CXCR4, o AMD3100, interrompe a adesão de CPs às CEMOs e estimula a sua mobilização para a circulação *in vivo*. Numa cultura de CPs com CEMOs, vários fármacos como o bortezomib, a dexametasona, o melfalano e a doxorrubicina em combinação com o AMD3100, proporcionaram um aumento na eficiência da apoptose de CPs, devido à inibição da adesão de CPs às CEMOs. A combinação de AMD3100 com bortezomib também levou a uma diminuição da carga tumoral *in vivo*. Este fármaco não foi testado em casos de MM, mas os resultados preliminares indicam que o AMD3100 pode ter um papel inibitório importante na neovascularização induzida pelas CEPs do MM (60).

As neoplasias malignas, como o MM, necessitam claramente de terapia combinada, incluindo fármacos que interfiram não só nas células cancerígenas, mas também na vasculatura (1).

VIII – MATERIAIS E MÉTODOS

A literatura utilizada nesta revisão bibliográfica foi obtida a partir do PubMed. A pesquisa foi feita tendo por base as seguintes palavras-chave: “multiple myeloma”, “angiogenesis”, “angiogenic factors”, “endothelial progenitor cells”, “bone microenvironment”, “Antiangiogenic Therapeutic”.

A pesquisa restringiu-se aos filtros “*Review*”, “*full text*” e foram selecionados artigos em inglês e português. A pesquisa foi restrita ao período compreendido entre 1998 e 2018.

IX – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A angiogénese é um dos mecanismos mais importantes para que ocorra o crescimento, a invasão da MO e a posterior disseminação das CP no MM. São vários os fatores que contribuem para a angiogénese. Podem destacar-se os fatores de crescimento, a interação que ocorre entre as células do MM e as células presentes no microambiente da MO e, ainda, o recrutamento aumentado de CEPs ao nível do desenvolvimento do tumor na MO (49).

As interações entre as CP e o microambiente da MO são imprescindíveis para o crescimento e sobrevivência das células tumorais, bem como para o desenvolvimento da resistência à terapia, da angiogénese tumoral e da doença óssea do mieloma (61).

O MM geralmente é precedido por uma condição progressiva da doença, a GMSI. Essa evolução gradual na patogénese do MM é uma oportunidade única para a identificação de marcadores precoces que permitam identificar a progressão da doença, adaptar a terapêutica a cada paciente e prever a sua resposta ao tratamento (61).

Todos os estudos feitos até hoje e que relacionam a progressão do MM com a angiogénese, permitiram a obtenção de fármacos anti-angiogénicos. A sobrevida média dos pacientes com MM aumentou desde a introdução da talidomida, da lenalidomida e do bortezomib juntamente com o transplante autólogo. Várias combinações de talidomida, de lenalidomida e bortezomib, quando combinadas com melfalano e prednisona ou outros fármacos, como terapias de primeira linha ou em tratamentos recidivantes, proporcionaram maiores taxas de resposta global e sobrevivência global superior. No entanto, a maioria dos pacientes com MM ainda recai e requer uma mudança na terapêutica. Neste sentido, são necessários novos fármacos que tenham como alvo, não

só as CP, mas também a interação que se verifica entre as CP e o microambiente da MO (53).

X – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

- O MM continua a ser uma patologia incurável e com recidivas constantes, em que o microambiente medular desempenha um papel crucial na sua evolução.

- O desenvolvimento de biomarcadores para identificar os pacientes com probabilidade de progredir para MM ativo irá ser essencial para evitar ou retardar a progressão da doença (61).

- O desenvolvimento de fármacos que tenham como alvo as moléculas envolvidas na progressão da doença, podem ajudar a prevenir ou retardar a progressão da doença em doentes de alto risco e em doentes com GMSI ou MMI (61).

- A terapêutica disponível atualmente tem efeitos secundários debilitantes. Neste sentido e de forma a aumentar as taxas de resposta, segurança e sobrevivência, será importante identificar sub-grupos de doentes que irão beneficiar de uma determinada terapêutica com uma toxicidade controlável (53).

- As anomalias existentes na vasculatura tumoral e o fluxo sanguíneo comprometido levam à existência de um microambiente medular anormal, caracterizado por hipóxia, hipertensão e acidose. Estas características do microambiente constituem uma barreira à terapêutica e, por isso, normalizar a vasculatura permitirá normalizar também o microambiente, tornando-o mais suscetível à terapêutica. Neste sentido, a terapêutica anti-angiogénica tem um papel bastante importante no tratamento do MM por aumentar a eficácia do tratamento quando co-administrada com outros fármacos (53).

- A terapêutica atual de primeira linha, constituída por várias combinações de talidomida, lenalidomida e bortezomib com melfalano e prednisolona, apresenta valores de resposta favoráveis, contudo a taxa de recaída ainda é alta e, portanto, há necessidade de fazer alterações. Nestas situações uma das alternativas são os anticorpos monoclonais direcionados para o CD38, tais como o Daratumab e o Isatuximab (53).
- A resistência aos fármacos anti-angiogénicos é também uma dificuldade verificada durante o tratamento do MM. A utilização de fármacos direcionados para diferentes fatores angiogénicos e/ou a combinação de diferentes estratégias poderá ser uma opção para maximizar o efeito terapêutico (49).
- Os fármacos anti-angiogénicos levam a um aumento limitado da sobrevivência livre de progressão, seguido de uma recaída na angiogénese e no crescimento do tumor. É necessário otimizar os regimes de tratamento e aumentar os conhecimentos em relação à angiogénese tumoral e, ainda, ao desenvolvimento de resistências aos fármacos. Neste sentido, torna-se fundamental que sejam estabelecidos biomarcadores válidos de forma a que os tratamentos possam ser personalizados e que permitam identificar sub-populações de doentes de acordo com a resposta à terapêutica (49).
- É necessária a continuação do estudo dos mecanismos fisiopatológicos e dos mediadores envolvidos na angiogénese, de forma a encontrar uma estratégia terapêutica eficiente que iniba a angiogénese tumoral (53).
- As CEPs, por terem um papel importante nos diferentes estágios do MM, poderão ser utilizadas como biomarcadores de atividade da doença e, também, aplicadas para monitorizar a eficácia antitumoral da terapia antiangiogénica (16).

- Os fármacos atualmente disponíveis, principalmente aqueles que têm capacidade anti-angiogénica não têm mostrado efetividade e, por isso, seria útil perceber de que forma as CEPs poderão ser um alvo terapêutico, para impedir a mobilização destas a partir do nicho onde se encontram, o seu recrutamento e o *homing*, evitando, desta forma, que ocorra o desenvolvimento do MM (16).

- Vários estudos têm demonstrado a importância do CXCR4 na proliferação, na invasão, na disseminação e na resistência à terapêutica, no MM. Desta forma, podemos assumir que o CXCR4 pode ter um papel patológico importante em diferentes estádios do MM. A avaliação da via de expressão e sinalização do CXCR4, juntamente com o seu ligando e com outras moléculas com as quais este interaja, pode ter um valor prognóstico significativo para o MM. Embora as intervenções terapêuticas direcionadas ao recetor ou ao seu ligando não sejam suficientemente eficientes, uma melhor compreensão do papel da via CXCR4 pode fornecer respostas sobre como o MM progride e recai e como os clones de CP resistentes a medicamentos persistem. Tudo isto será importante para o desenvolvimento de terapêuticas eficientes para evitar a disseminação do tumor no MM (62).

- As *chimeric antigen receptor (CAR) T cells* encontram-se atualmente em estudo e representam uma terapêutica promissora para o MM. Têm sido obtidos resultados iniciais impressionantes ao direcionar estas células contra o *B-cell maturation antigen (BCMA)*, contudo, na maioria dos doentes, a doença acaba por progredir. Neste sentido, são necessárias novas estratégias para melhorar a terapia com este tipo de células. Uma das estratégias poderá ser a utilização de outros antígenos em combinação com o *BCMA* como alvo destas células (63).

XI - BIBLIOGRAFIA

1. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron*. 2011;4(3):325–37.
2. Ria R, Reale A, Luisi A De, Ferrucci A, Moschetta M, De Luisi A et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Am J Blood Res*. 2011;1(1):76–89.
3. Trindade F. Inibição da angiogénese em tumores sólidos: aplicação dos lipossomas catiónicos [master's thesis]. [Algarve]: Universidade do Algarve; 2013. 50 p.
4. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006;20(2):193–9.
5. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia*. 2007;21(1):44–52.
6. Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*. 2001;98(2):428–35.
7. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo G, Bagnato S, Giustolisi G, Floridia P et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. *Haematologica*. 2000;85(8):800 LP – 805.
8. Ribatti D, Vacca A, Rusnati M, Presta M. The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(3–4):327–34.
9. Vacca A, Ria R, Semeraro F, Merchionne F, Coluccia M, Bocciarelli A et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003;102(9):3340–8.
10. Folberg R, Hendrix MJC, Maniotis A. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000;156(2):361–81.
11. Ria R, Piccoli C, Cirulli T, Falzetti F, Mangialardi G, Guidolin D et al. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1678–85.
12. Ribatti D, Nico B, Vacca A. Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene*. 2006;25(31):4257–66.
13. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med*. 2002;8(9):918–21.
14. Vacca A, Ria R, Ribatti D, Semeraro F, Djonov V, Di Raimondo F et al. A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. *176 Haematol Hematol*. 2003;88(2):176–85.
15. Ria R, Vacca A, Russo F, Cirulli T, Massaia M, Tosi P et al. A VEGF-dependent autocrine loop mediates proliferation and capillarogenesis in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Thromb Haemost*. 2004;92(6):1438–45.
16. Tenreiro MM, Correia ML, Brito MA. Endothelial progenitor cells in multiple myeloma neovascularization: a brick to the wall. *Springer Science*. 2017;20(4):443–62.
17. Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a006692

18. Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith ELP, Maroney J, Chen L, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: Implications and significance. *Blood*. 2005;105(8):3286–94.
19. Ribatti D, Crivellato E, Roccaro AM, Ria R, Vacca A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. *Clin Exp Allergy*. 2004;34(11):1660–4.
20. Scavelli C, Nico B, Cirulli T, Ria R, Di Pietro G, Mangieri D et al. Vasculogenic mimicry by bone marrow macrophages in patients with multiple myeloma. *Oncogene*. 2008;27(5):663–74.
21. Nico B, Mangieri D, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Mast cells contribute to vasculogenic mimicry in multiple myeloma. *Stem Cells Dev*. 2008;17(1):19–22.
22. Fukushima N, Satoh T, Sano M, Tokunaga O. Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: A strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2001;42(4):709–20.
23. Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and Identifying Monoclonal Gammopathies. 2000;46(8 Pt 2):1230-8.
24. Rodrigues E. Prevalência do mieloma múltiplo na região autónoma da Madeira [master's thesis]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa-Faculdade de Farmácia; 2013. 66 p.
25. Glavey S V, Leung N. Monoclonal gammopathy : The good, the bad and the ugly. *Blood Reviews*. 2016;30(3):223–31.
26. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 2006; 134(6):573–89.
27. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2010;5(2):62-9.
28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538–48.
29. Moreau P, San-Miguel J, Sonneveld P, Mateos M V., Zamagni E. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl_4):iv52-iv61.
30. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 6ª ed, Artmed; 2007. 14-28 p.
31. Santos C, Costa J, Ribeiro A. Alterações moleculares e celulares no MM - implicações clínicas e terapêuticas [master's thesis]. [Coimbra]: Universidade de Coimbra; 2015. 255 p.
32. Wickramasinghe S, Porwit A, Erber W. *Blood and Bone Marrow Pathology*. 2ª ed, Elsevier Ltd; 2011. 19–44 p.
33. Bydlowski S, Levy D, Ruiz J, Pereira J. Alimoghaddam K (ed) *Stem cell biology in normal life and diseases*. 1ª ed. Rijeka: InTech;2013. 18–31 p.
34. Ghobrial IM, Leleu X, Manier S, Roccaro AM, Sacco A. Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:157496
35. Dreyfuss J, Oliveira J. Extracellular matrix in hematopoiesis and hematologic malignancies. *Rev. Bras. Hematol*. 2008;30(5):398-405.
36. Dimopoulos MA, Terpos E. Multiple myeloma. *Ann Oncol*. 2010;21(Supplement 7):vii143–50.
37. Edwards CM, Zhuang J, Mundy GR. The pathogenesis of the bone disease of multiple myeloma. *Bone*. 2008;42(6):1007–13.
38. Yamashita T. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation.

- World J Orthop. 2012;3(11):175.
39. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011;364:1046–60.
 40. Landgren O, Morgan GJ. Biological frontiers in multiple myeloma: From biomarker identification to clinical practice. *Clin Cancer Res*. 2014;20(4):804-13.
 41. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863–9.
 42. Moschetta M, Mishima Y, Sahin I, Manier S, Glavey S, Vacca A et al. Biochimica et Biophysica Acta Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *BBA - Rev Cancer*. 2014;1846(1):26–39.
 43. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016;91(1):101–19.
 44. Chou T. Multiple Myeloma : Recent progress in diagnosis and treatment. *J Clin Exp Hematop*. 2012;52(3):149–59.
 45. Roche. O que é o Mieloma Múltiplo? [Internet]. Roche; 2019. Available from: <https://www.roche.pt/sites-tematicos/infocancro/index.cfm/tipos/mieloma-multiplo/>.
 46. Webpathology. Myeloma : Rouleaux formation [Internet]. Webpathology; 2019. Available from: <https://www.webpathology.com/image.asp?case=768&n=17>.
 47. Associação portuguesa contra a leucemia. Mieloma Múltiplo [Internet]. APCL;2019. Available from: <https://www.apcl.pt/pt/doencas-do-sangue/mieloma-multiplo>.
 48. Kyle RA, Gertz MA, Rajkumar SV (ed) Multiple Myeloma: Diagnosis and treatment. Springer; 2014. 310 p.
 49. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Antiangiogenic Therapeutic Approaches in Multiple Myeloma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012;12(7):768–75.
 50. European Medicines Agency. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. In: thalidomide [Internet]. EMA; 2019. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/thalidomide-celgene-epar-product-information_pt.pdf
 51. Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B et al. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2009;2:1–10.
 52. European Medicines Agency. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. In: revlimid [Internet]. EMA; 2019. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/revlimid-epar-product-information_pt.pdf
 53. Ribatti D, Vacca A. New insights in anti-angiogenesis in multiple myeloma. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2031.
 54. European Medicines Agency. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento. In: velcade [Internet]. EMA; 2019. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/velcade-epar-product-information_pt.pdf
 55. Doss S, Hay N, Sutcliffe F. NICE guidance on bortezomib and thalidomide for first-line treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2011;12(9):837–8.
 56. Torimura T, Iwamoto H. Antiangiogenic and antitumor activities of aflibercept, a soluble VEGF receptor 1 and 2, in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *NEO*. 2016;18(7):413–24.
 57. Baek Y-Y, Kwon Y-G, Han S, Kim J, Ha K-S, You JC et al. Arg-Leu-Tyr-Glu tetrapeptide inhibits tumor progression by suppressing angiogenesis and vascular

- permeability via VEGF receptor-2 antagonism. *Oncotarget*. 2016;8(7):11763–77.
58. Podar K, Tonon G, Sattler M, Tai Y-T, LeGouill S, Yasui H et al. The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(51):19478–83.
59. Moschetta M, Mishima Y, Kawano Y, Manier S, Paiva B, Palomera L et al. Targeting vasculogenesis to prevent progression in multiple myeloma. *Leukemia*. 2016;30(5):1103–15.
60. Yin Y, Huang L, Zhao X, Fang Y, Yu S, Zhao J et al. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;50(1):61–7.
61. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of Myeloma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2011;6(1):249–74.
62. Pellegrino A, Ria R, Di Pietro G, Cirulli T, Surico G, Pennisi A et al. Bone marrow endothelial cells in multiple myeloma secrete CXC-chemokines that mediate interactions with plasma cells. *Br J Haematol*. 2005;129(2):248–56.
63. Timmers M, Roex G, Wang Y, Campillo-Davo D, Van Tendeloo VFI, Chu Y et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cell Therapy in Multiple Myeloma: Beyond B Cell Maturation Antigen. *Front Immunol*. 2019;10(July):1–12.